



PRESS RELEASE

2019年4月25日

琉球大学

新潟大学

神戸大学

川の水から人獣共通感染症の病原体と保菌動物の候補を同時検出  
～レプトスピラ症予防に向けた環境 DNA 分析手法を開発～

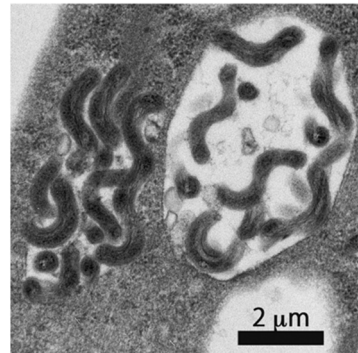
琉球大学の佐藤行人特命講師、トーマ・クラウディア准教授、新潟大学のサトウ恵助教、神戸大学の源利文准教授らの研究チームによる成果が、英国の学術雑誌「Scientific Reports」誌に掲載されました。

<発表のポイント>

◆水中に存在する「環境 DNA」を分析する手法で、人獣共通感染症を起こす細菌レプトスピラの DNA を川の水から直接検出することに成功

◆さらに、動物に由来する DNA も同時に分析することで、レプトスピラの保菌動物候補（イノシシ・オオコウモリなど）を推定できることを示した

◆沖縄県だけでなく様々な国や地域に応用でき、予防方針を得ることに役立つ



細胞内に見られるレプトスピラ

## PRESS RELEASE

### <発表概要>

琉球大学・戦略的研究プロジェクトセンターの佐藤行人・特命講師、同大学院・医学研究科のトーマ・クラウディア・准教授、新潟大学・医学部保健学科のサトウ恵・助教、神戸大学大学院・人間発達環境学研究科の源利文・准教授らは、保菌動物の尿から川や土壌を経由してヒトに感染する病原体レプトスピラ（注1）について、河川の水から直接 DNA を検出することに成功しました。さらに、レプトスピラと同時に出現する動物の DNA を分析することによって、レプトスピラの保菌動物の候補（イノシシやオオコウモリなど）を推定できることを示しました。

レプトスピラは、哺乳類を中心に多くの動物に感染する人獣共通感染症（注2）の病原細菌です。保菌動物の尿から河川や土壌を経由してヒトに感染し、発熱や、時には重篤な腎障害などを引き起こします。しかし、レプトスピラは環境中での濃度が低くて検出が難しく、また、環境サンプルから単離・培養をすることも比較的困難です。そのため、レプトスピラが野外でどのように分布し生息しているかについては、多くが未解明であり、レプトスピラ症の感染リスクを評価することも容易ではありませんでした。

そこでこの研究は、水中に存在する「環境 DNA」（注3）に着目し、河川水から直接レプトスピラの DNA を検出することに成功しました。夏季（7月～10月）にレプトスピラ症の発生が報告されている沖縄島の河川で採水を行い、ろ過により懸濁物を高度に濃縮してから（図1a）、DNA を抽出しました（図1b）。抽出された環境 DNA から、レプトスピラが保有する遺伝子（*lipL32* と 16S rRNA）（注4,5）を PCR（注6）により増幅して、その DNA 配列を次世代シーケンサー（注7）という機器で大量解析しました（図1c）。



図1. レプトスピラ DNA 検出法の概要. (a) 500 mL の河川水をろ過して懸濁物を濃縮. (b) ろ紙から DNA を抽出し、レプトスピラが保有する *lipL32* と 16S rRNA 遺伝子、動物のミトコンドリア DNA が保有する 12S rRNA 遺伝子、細菌全般が保有する 16S rRNA-V4 遺伝子をターゲットとした PCR 増幅を行う. (c) 増幅した DNA を次世代シーケンサーで大量配列決定し、大型コンピュータで解析することで、配列が由来する生物（レプトスピラ、動物、細菌の種）を特定.

その結果、病原性の *Leptospira alstonii* や中間型の *L. wolffii* など 6 種のレプトスピラが検出され、その DNA 配列数が採水時の雨の量と有意に相関することも確かめられました（図2）。さらに、同じ環境 DNA サンプルを用いて、レプトスピラと同時に出現する動物

PRESS RELEASE

の DNA を分析したところ、レプトスピラの保菌動物であることが知られるイノシシやオオコウモリなど 10 種の動物を特定することが出来ました (図 3)。これらの動物の中には、レプトスピラとの関係が不明瞭な底生魚類やイモリなども含まれています。これらは保菌動物ではなく、雨による濁流と相関して検出されたに過ぎない可能性があります。一方で、アフリカの一部地域ではウナギやナマズ類からレプトスピラの抗体が検出されたという報告もあるため、沖縄県でもこれらの魚類等を調査する必要はあるかもしれません。

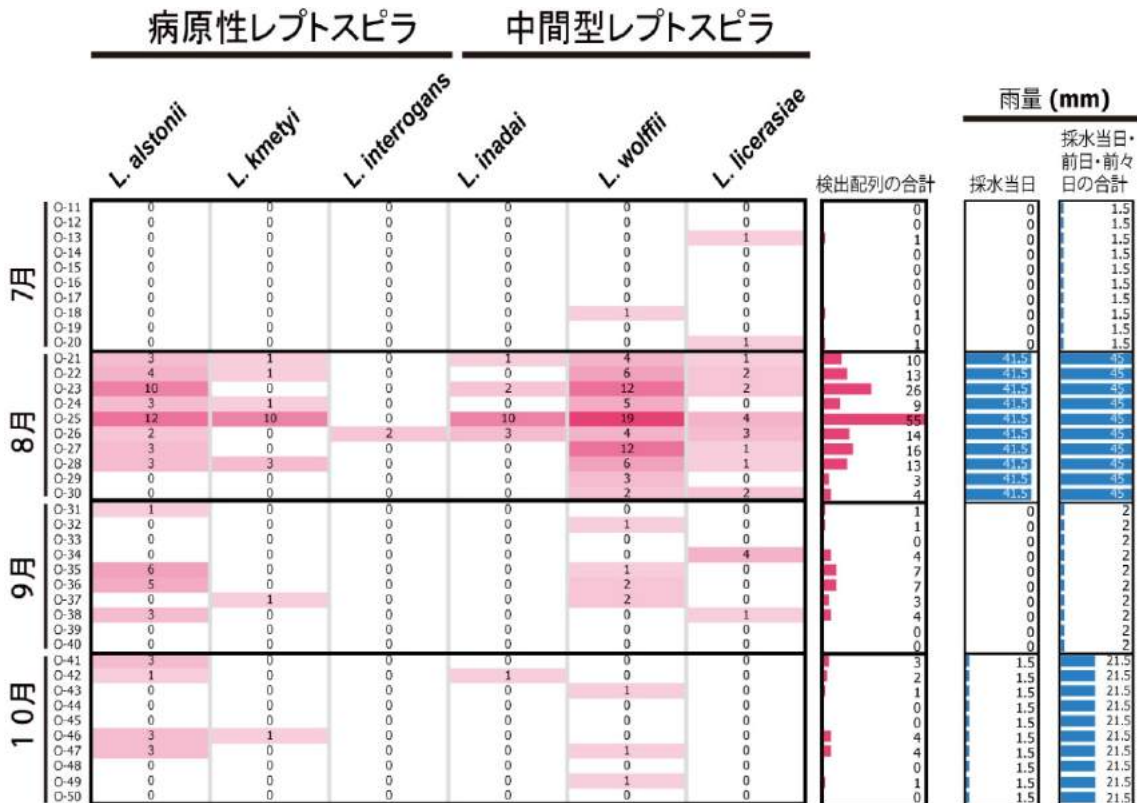


図 2. レプトスピラの環境 DNA 検出。縦の列は検出された 6 種のレプトスピラを表し、横の行は各採水サンプル(月あたり 10 個)を表す。色が濃いほど多くのレプトスピラ DNA 配列が検出されたことを表す。この DNA 配列数は、河川水が含むレプトスピラの菌数に比例する数値だが、菌数そのものではない。雨量は気象庁データより、当該論文 Sato et al. (2019)に基づき作成。

また本研究では、同じ手法で細菌類全般を対象とした DNA 分析も行っており、河川水中でレプトスピラと同時に出現する 12 種の環境細菌を検出しています。その中には、実験下でレプトスピラと共にバイオフィーム(注 8) を形成することが指摘されている *Sphingomonas* 類が含まれました。保菌動物から環境中へ排出されたレプトスピラは、他の共生細菌と共に凝集して環境中に存続し、雨や濁流などによって再び河川水中に拡がるということが推察されます。このように共生細菌の候補も DNA 分析することで、野外でのレプトスピラの生息状況や生態について重要な情報や理解が得られていくと期待されます。

PRESS RELEASE

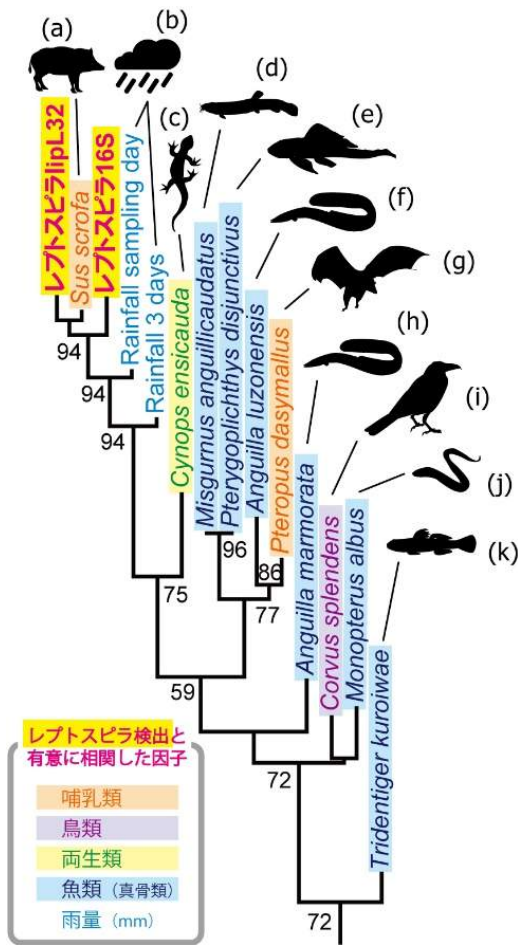


図 3.レプトスピラと有意に相関して検出された動物および環境因子. 左から、レプトスピラとの相関が総合的に高い順に並んでいる. 太字で示した「レプトスピラ」(*lipL32* および *16S*)と近い位置にあり、それらとつながる線(内部枝)が短い因子ほど、レプトスピラ検出との相関が強いことを示す. (a)イノシシ、(b)雨量、(c)シリケンイモリ、(d)ドジョウ、(e)マダラロリカリア(ブレコ)、(f)ウナギ(種小名は不詳)、(g)クビワオオコウモリ、(h)オオウナギ、(i)イエガラズ、(j)タウナギ、(k)ナガノゴリ. 樹形図の結節点に示された数値は、その分岐の確からしさ(%)を表す.当該論文 Sato et al. (2019)に基づき作成.

以上の研究結果から、レプトスピラ症の予防においては、雨による濁流が見られる川や、イノシシなどの野生哺乳類が生息する付近の水場や泥土を避けるのが望ましいということが示唆されます。また、この研究によって開発された、環境 DNA 分析に基づくレプトスピラの直接検出と保菌動物候補の推定方法は、沖縄県だけでなく様々な国や地域にも適用できます。レプトスピラ症が度々発生する地域において、その原因となるレプトスピラの種を検出・特定することに加えて、まだ報告されていない未知の保菌動物を探索すること、レプトスピラの生存に関与していると考えられる共生細菌を探索することにも応用できます。そのため本研究の成果は、レプトスピラ症の環境リスク評価、保菌動物の管理、衛生環境の改善などに役立てられることが期待されます。この研究は、琉球大学、新潟大学、神戸大学の研究者によって行われたもので、細菌学、DNA 分析学、生命情報科学、生態学の専門家など様々な分野の研究者が共同研究することによって実現しました。



## PRESS RELEASE

### <用語解説>

**(注1) レプトスピラ：**らせん形の細長い細菌。20種ほどが知られており、病原性・中間型・非病原性に分けられる。病原性と中間型の種は、人獣共通感染症のレプトスピラ症を起こす。

**(注2) 人獣共通感染症：**ヒトと動物（哺乳類・鳥類など）に、共通して感染する病原体によって発症する疾患（病気）のこと。病原体となるものは、インフルエンザウイルスなどのほか細菌、真菌、原虫、寄生虫など多岐に渡る。

**(注3) 環境 DNA：**河川水や土壌などの環境媒質中に微量に含まれる生物由来の DNA 断片。主な由来は、付近に生息する生物の皮膚片や羽毛、粘液、細胞片、死骸などであると考えられている。

**(注4) LipL32：**病原性レプトスピラが共通して有する遺伝子で、細胞膜上タンパク質をコードする。

**(注5) 16S rRNA：**タンパク質の生成に関わるリボソーム RNA の一部をコードする遺伝子。細菌などの原核生物に広く共通する遺伝子であるため、その種判別に多用される。

**(注6) PCR：**ポリメラーゼ連鎖反応の略で、DNA の集合から既知の配列を持つ任意の領域を生化学的に増幅する方法。ごく少量の環境 DNA サンプルから、多数のコピー配列を得て分析に使用することができる。

**(注7) 次世代シーケンサー：**数千万から数億個（分子）の DNA について、同時並列的に塩基配列を決定することができる機器。2004 年ごろから普及し、現在は生物学で使われる重要テクノロジーの1つとなっている。

**(注8) バイオフィルム：**様々な細菌類が岩や泥などの表面で互いに付着・凝集して形成するシート状の構造物で、自然界の多くの場所に見られる。多種の微生物が相互作用しながら生存する場となる。

### <謝辞>

本研究は、次の研究助成のもとで行われました： 沖縄感染症研究拠点形成促進プロジェクト「動物媒介性感染症対策の沖縄での施策提言とネットワーク形成に関する研究」、文部科学省・科学研究費補助金（17K1929）、および琉球大学・時空間ゲノミクスプロジェクト。また、琉球大学・研究基盤センターおよび戦略的研究プロジェクトセンターによる共同利用・共同研究の支援を受けました。ならびに、情報・システム研究機構・国立遺伝学研究所が有する遺伝研スーパーコンピュータシステムを利用しました。



琉球大学  
UNIVERSITY OF THE RYUKYUS



新潟大学  
NIIGATA UNIVERSITY



神戸大学

## PRESS RELEASE

### <論文情報>

**論文タイトル:** Environmental DNA metabarcoding to detect pathogenic *Leptospira* and associated organisms in leptospirosis-endemic areas of Japan

(和訳) 日本のレプトスピラ発生地域における病原性レプトスピラおよび関連生物の環境 DNA メタバーコーディング検出

**雑誌名:** Scientific Reports

**著者:** Yukuto Sato\*, Masaru Mizuyama, Megumi Sato, Toshifumi Minamoto, Ryosuke Kimura, & Claudia Toma\*

佐藤行人 (琉球大 戦略的研究プロジェクトセンター 特命講師)、水山克 (琉球大院 医学研究科 非常勤職員)、サトウ恵 (新潟大 医学部保健学科 助教)、源利文 (神戸大院 人間発達環境学研究科 准教授)、木村亮介 (琉球大院 医学研究科 准教授)、トーマ・クラウディア (琉球大院 医学研究科 准教授)

**DOI 番号:** 10.1038/s41598-019-42978-1

**アブストラクト URL:** [www.nature.com/articles/s41598-019-42978-1](http://www.nature.com/articles/s41598-019-42978-1)